

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

22.02.01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2000年 2月22日

REC'D 17 APR 2001	
WIPO	PCT

出 願 番 号  
Application Number:

特願2000-043786

出 願 人  
Applicant (s):

株式会社ホギメディカル

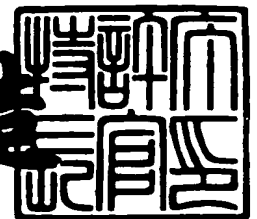
JP 01/1285  
E-U

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2001年 3月30日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3024052

【書類名】 特許願

【整理番号】 P0000202

【提出日】 平成12年 2月22日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61L 15/28  
A61K 31/72

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区湯島1丁目12番4号, 株式会社 ホギメ  
ディカル内

【氏名】 徐 吉夫

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区湯島1丁目12番4号, 株式会社 ホギメ  
ディカル内

【氏名】 青島 元法

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区湯島1丁目12番4号, 株式会社 ホギメ  
ディカル内

【氏名】 田辺 孝治

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区湯島1丁目12番4号, 株式会社 ホギメ  
ディカル内

【氏名】 松下 幸一

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区湯島1丁目12番4号, 株式会社 ホギメ  
ディカル内

【氏名】 井上 利樹

【特許出願人】

【識別番号】 000137052

【氏名又は名称】 株式会社 ホギメディカル

【代理人】

【識別番号】 100087550

【弁理士】

【氏名又は名称】 梅村 莞爾

【電話番号】 03(3255)2531

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 055240

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維とその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 セルロース分子を構成するグルコース単位中の水酸基を置換度が 0.5 - 1.0 未満となるようにカルボキシメチル化した天然もしくはは再生セルロース繊維に、凝固蛋白質を付与してなることを特徴とする可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 2】 凝固蛋白質は、フィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第 XIII 因子の 3 種であることを特徴とする請求項 1 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 3】 凝固蛋白質は、前記カルボキシメチル化した天然もしくはは再生セルロース繊維に塗布することにより付与されたものであることを特徴とする請求項 2 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 4】 凝固蛋白質は、溶液の噴霧により塗布されてなるものであることを特徴とする請求項 3 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 5】 凝固蛋白質は、フィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第 XIII 因子の 3 種がまとめて一度に塗布されたものであることを特徴とする請求項 3 又は 4 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 6】 凝固蛋白質は、フィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第 XIII 因子の 3 種がそれぞれ単独で順次塗布されたものであることを特徴とする請求項 3 又は 4 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 7】 凝固蛋白質は、前記カルボキシメチル化した天然もしくはは再生セルロース繊維と化学的に結合することにより付与されたものであることを特徴とする請求項 2 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 8】 凝固蛋白質は、カルボジイミドで処理した前記カルボキシメチル化した天然もしくはは再生セルロース繊維と反応することにより化学的に結合されてなるものであることを特徴とする請求項 7 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 9】 凝固蛋白質は、フィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第 XIII 因子の 3 種がまとめて一度に化学的結合されたものであることを特徴とする請求項 7 又は 8 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 10】 凝固蛋白質は、フィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第 XIII 因子の 3 種がそれぞれ単独で順次化学的結合されたものであることを特徴とする請求項 7 又は 8 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 11】 前記天然もしくは再生セルロース繊維を、凝固蛋白質の付与後に粉状にしてなることを特徴とする請求項 1 乃至 10 の何れかに記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 12】 凝固蛋白質としてフィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第 XIII 因子の 3 種をそれぞれ別々に単独で塗布することにより付与した前記天然もしくは再生セルロース繊維を、該凝固蛋白質の付与後にそれぞれ粉状として混合してなることを特徴とする請求項 1 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 13】 凝固蛋白質は、溶液の噴霧により塗布されてなるものであることを特徴とする請求項 12 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 14】 凝固蛋白質としてフィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第 XIII 因子の 3 種をそれぞれ別々に単独で化学的結合することにより付与した前記天然もしくは再生セルロース繊維を、該凝固蛋白質の付与後にそれぞれ粉状として混合してなることを特徴とする請求項 1 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 15】 凝固蛋白質は、カルボジイミド試薬で処理した前記カルボキシメチル化した天然もしくは再生セルロース繊維と反応することにより化学的に結合されてなるものであることを特徴とする請求項 14 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 16】 前記天然もしくは再生セルロース繊維が、数本の甘撚りの単糸からなる引き揃え糸であることを特徴とする請求項 1 乃至 15 の何れかに記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 17】 前記天然もしくは再生セルロース繊維が、数本の甘撚りの単

糸からなる引き揃え糸を平織りもしくは綾織りした織地であることを特徴とする請求項 1 乃至 1 5 の何れかに記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 1 8】引き揃え糸の太さは、2 0 - 1 0 0 番手であることを特徴とする請求項 1 6 又は 1 7 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 1 9】前記天然もしくは再生セルロース繊維が、半毛処理を施した綿状体であることを特徴とする請求項 1 乃至 1 5 の何れかに記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維。

【請求項 2 0】天然もしくは再生セルロース繊維を水酸化ナトリウム水溶液で処理した後、モノクロロ酢酸溶液と反応させてセルロース分子を構成するグルコース単位中の水酸基を置換度（エーテル化度）が 0. 5 - 1. 0 未満となるようにカルボキシメチル化し、精製し、さらに、凝固蛋白質であるフィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第 XIII 因子の 3 種の溶液を噴霧して塗布することにより該凝固蛋白質を付与し、乾燥してなることを特徴とする可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の製造方法。

【請求項 2 1】フィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第 XIII 因子の 3 種の溶液の噴霧は、まとめて一度に行われてなることを特徴とする請求項 2 0 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の製造方法。

【請求項 2 2】フィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第 XIII 因子の 3 種の溶液の噴霧は、それぞれ単独で順次行われてなることを特徴とする請求項 2 0 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の製造方法。

【請求項 2 3】天然もしくは再生セルロース繊維を水酸化ナトリウム水溶液で処理した後、モノクロロ酢酸溶液と反応させてセルロース分子を構成するグルコース単位中の水酸基を置換度（エーテル化度）が 0. 5 - 1. 0 未満となるようにカルボキシメチル化し、精製し、次いで、カルボジイミド試薬で処理した後、さらに、凝固蛋白質であるフィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第 XIII 因子の 3 種の溶液で処理して化学的に結合することにより該凝固蛋白質を付与し、乾燥してなることを特徴とする可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の製造方法。

【請求項 2 4】フィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第 XIII 因子の 3 種の溶液の処理は、まとめて一度に行われてなることを特徴とする請求項 2 3 に記

載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の製造方法。

【請求項 2 5】フィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第 XIII 因子の 3 種の溶液の処理は、それぞれ単独で順次行われてなることを特徴とする請求項 2 3 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の製造方法。

【請求項 2 6】凝固蛋白質の付与後、乾燥してから前記天然もしくは再生セルロース繊維を粉状にしてなることを特徴とする請求項 2 0 乃至 2 5 の何れかに記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の製造方法。

【請求項 2 7】フィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第 XIII 因子の 3 種の溶液の噴霧はそれぞれ別々に単独で行われ、該凝固蛋白質の付与後、乾燥してから前記天然もしくは再生セルロース繊維をそれぞれ粉状とし、これを混合してなることを特徴とする請求項 2 0 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の製造方法。

【請求項 2 8】フィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第 XIII 因子の 3 種の溶液での化学的結合はそれぞれ別々に単独で行われ、該凝固蛋白質の付与後、乾燥してから前記天然もしくは再生セルロース繊維をそれぞれ粉状とし、これを混合してなることを特徴とする請求項 2 3 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の製造方法。

【請求項 2 9】モノクロロ酢酸溶液とは 4 ～ 1 8 時間反応させてなることを特徴とする請求項 2 0 乃至 2 8 の何れかに記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の製造方法。

【請求項 3 0】天然もしくは再生セルロース繊維が、数本の甘撚りの単糸からなる引き揃え糸であることを特徴とする請求項 2 0 乃至 2 9 の何れかに記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の製造方法。

【請求項 3 1】天然もしくは再生セルロース繊維が、数本の甘撚りの単糸からなる引き揃え糸を平織りもしくは綾織りした織地であることを特徴とする請求項 2 0 乃至 2 9 の何れかに記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の製造方法。

【請求項 3 2】引き揃え糸の太さは 2 0 - 1 0 0 番手であることを特徴とする請求項 3 0 又は 3 1 に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の製造方法。

【請求項 3 3】天然もしくは再生セルロース繊維が、半毛処理を施した綿状体であることを特徴とする請求項 2 0 乃至 2 9 の何れかに記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の製造方法

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本願発明は、細胞接着促進効果を有する凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血材とその製造方法に係り、詳しくは、体内及び体外の創傷患部に施用することにより血液凝固作用及び細胞拡張作用を促す体内吸収性の可溶性創傷被覆止血材料とその製造方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

従来の創傷止血材としては、酸化セルロース製剤、ゼラチン製剤、及び微繊維性コラーゲンの 3 種が知られ、医薬品あるいは医療用具として既に使用されている。酸化セルロース製剤は、主構造を構成しているポリ無水グルコン酸がヘモグロビンと著しい親和性をもち、これと塩を形成することによって止血作用をしめす。この凝血促進作用は、血液凝固機序に対する作用より、むしろ物理的効果と考えられている。すなわち、血液の浸潤により本剤が膨張し褐色もしくは黒色のゼラチン状の塊となって凝血物の形成を促進し、局部止血の止血補助剤として効果を発揮し、約 2 週間で吸収されるものである。また、微繊維性コラーゲンは牛真皮などから抽出した天然コラーゲンを主な構成物としており、血液の接触により血小板凝集の形成を介して止血を行う。

【0 0 0 3】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、酸化セルロース製剤は血液凝固機序に直接作用しないため、凝血作用が弱く、さらに体内で完全に吸収されるのに約 2 週間を要するため、その間患部の炎症、癒着等を引き起こす原因となる。また、ゼラチン製剤は、吸収性は酸化セルロースに比べ遅く、さらに動物由来の材料であるため、狂牛病、クロイツフェルト・ヤコブ病をはじめとする様々な感染症の要因となる可能性が高い



。また、微繊維性コラーゲンは完全に吸収されるのに1ヶ月以上を要し、その間患部の炎症、癒着を引き起こす。さらには材料が牛由来のため、狂牛病、未知のウイルスによる感染等の危険性を持っている。

## 【0004】

すなわち、上記各止血材を用いた従来の方法による止血は、体内吸収性が悪く、炎症、癒着などを引き起こし易く、さらには未知の感染症に罹患する可能性がある危険性を有するものである。

## 【0005】

また、特開平10-77571号公報には、天然もしくは再生セルロース繊維のセルロース分子を構成するグルコース単位中の水酸基を部分的にエーテル化度が1.0以上となるようにカルボキシメチル化した、血液と接触した場合に迅速に溶解して血液と共にゼラチン状を呈して創傷面を覆い、止血効果をあげることとなる可溶性セルロース繊維について記載されている。

## 【0006】

しかしながら、カルボキシメチル基の置換度（エーテル化度）が1.0以上のものは、血液と接触しても迅速に溶解せず、大量の不要物が残留し、著しい止血効果を示さず、さらに、可溶化したカルボキシメチルセルロース繊維は血液凝固第XII因子を始めとする凝血酵素に何ら作用を示さない。

## 【0007】

さらに、特願平11-58412号には、天然もしくは再生セルロース繊維のセルロース分子を構成するグルコース単位中の水酸基を、カルボキシメチル基の置換度（エーテル化度）が0.5-1.0未満となるように部分的にカルボキシメチル化した可溶性創傷治癒止血セルロース繊維について記載されている。

## 【0008】

上記可溶性創傷治癒止血セルロース繊維は、血液と接触することにより迅速に溶解し、著しい止血効果を示すが、血液との接触にてのみ止血効果を示すもの、すなわち、血液中の血小板とフィブリンを相互作用して止血効果を示すものであり、出血の少ない、すなわち、血小板やフィブリンの少ない箇所（創部）の止血は効果が低い。

## 【0009】

## 【問題を解決するための手段】

そこで、かかる課題を解決すべく、本願発明者は鋭意検討した結果、凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維が、血液等の組織液の吸収性に優れ、血液と接触した場合には迅速に溶解し、凝血カスケードが不活性でも、凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維に含まれているトロンビンとフィブリノーゲンから変換されるフィブリンモノマーの凝集反応を促進することにより、さらには同可溶性創傷治癒止血セルロース繊維に含まれている血液凝固第XII因子の架橋反応が凝集物を安定化することにより止血効果を示す。すなわち、凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維は、凝固カスケードの酵素の活性化には関係なく、トロンビンによって作成したフィブリンモノマーの凝集を促進し、更に、創傷部の血液あるいは体液との接触により速やかに溶解することにより、創傷部への血小板の粘着と凝集を促し、また、接着蛋白であるフィブロネクチンと相互作用し、フィブロネクチンの細胞接着活性を促す作用を有することを見出した。

## 【0010】

すなわち、本願発明は、セルロース分子を構成するグルコース単位中の水酸基を置換度（エーテル化度）が0.5－1.0未満となるように部分的にカルボキシメチル化した天然もしくは再生セルロース繊維に、凝固蛋白質を付与してなるものであり、天然もしくは再生セルロース繊維を水酸化ナトリウム水溶液で処理した後、モノクロロ酢酸溶液と一定時間、好ましくは4－18時間反応させて、セルロース分子を構成するグルコース単位中の水酸基を部分的に置換度（エーテル化度）が0.5－1.0未満となるようにカルボキシメチル化し、精製したものに、凝固蛋白質としてフィブリノーゲン、トロンビンおよび血液凝固第XIII因子を付与し、乾燥することにより凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維としてなるものである。

## 【0011】

また、凝固蛋白質の付与は、前記カルボキシメチル化した天然もしくは再生セルロース繊維に塗布することにより、または前記カルボキシメチル化した天然も

しくは再生セルロース繊維と化学的に結合すること（すなわち、塗布のような物理的な結合ではない手段）により行うものである。

【0012】

そして、凝固蛋白質の塗布としては、具体的には、例えば、該凝固蛋白質を含む溶液を前記カルボキシメチル化した天然もしくは再生セルロース繊維に対して噴霧することにより行うとするものである。なお、この際、凝固蛋白質は、フィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第XIII因子の3種をまとめて一度に塗布することとするものでも、フィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第XIII因子の3種をそれぞれ単独で順次塗布することとするものでも何れでも良い。

【0013】

一方、凝固蛋白質の化学的結合としては、具体的には、例えば、カルボジイミド試薬で処理した前記カルボキシメチル化した天然もしくは再生セルロース繊維に該凝固蛋白質を含む溶液を加えて反応することにより行うとするものである。なお、この際、凝固蛋白質は、上記塗布の場合と同様に、フィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第XIII因子の3種をまとめて一度に化学的結合させることとするものでも、フィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第XIII因子の3種をそれぞれ単独で順次化学的結合させることとするものでも何れでも良い。

【0014】

また、本願発明は、上述のように凝固蛋白質を付与した前記天然もしくは再生セルロース繊維を、該凝固蛋白質の付与後に乾燥してから粉状に成形してなるものでもあり、該粉状体は、上述の通り、フィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第XIII因子の3種の凝固蛋白質を、まとめて一度に塗布又は化学的結合することにより付与することとした前記天然もしくは再生セルロース繊維を粉状とすることにより得たものでも、フィブリノーゲンとトロンビンと血液凝固第XIII因子の3種の凝固蛋白質を、それぞれ別々に単独で塗布又は化学的結合することにより付与することとした前記天然もしくは再生セルロース繊維をそれぞれ粉状とし、これらを混合することにより得たものでも、何れでも良い。

【0015】

また、本願発明においては、凝固蛋白質を付与させる前記天然もしくは再生セ

ルコース繊維を、数本の甘撚りの単糸からなる引き揃え糸、または数本の甘撚りの単糸からなる引き揃え糸を平織りもしくは綾織りした織地としたものでもあり、その際の引き揃え糸の太さを、20-100番手としたものでもある。

【0016】

また、本願発明は、前記天然もしくは再生セルコース繊維を、凝固蛋白質の付与前もしくは付与後に半毛処理を施して綿状体となるようにしたものでもある。

【0017】

さらに、本願発明は、これら引き揃え糸状、または織地状、または綿状とした天然もしくは再生セルコース繊維を、該凝固蛋白質の付与後に粉状に成形してなるものでもある。

【0018】

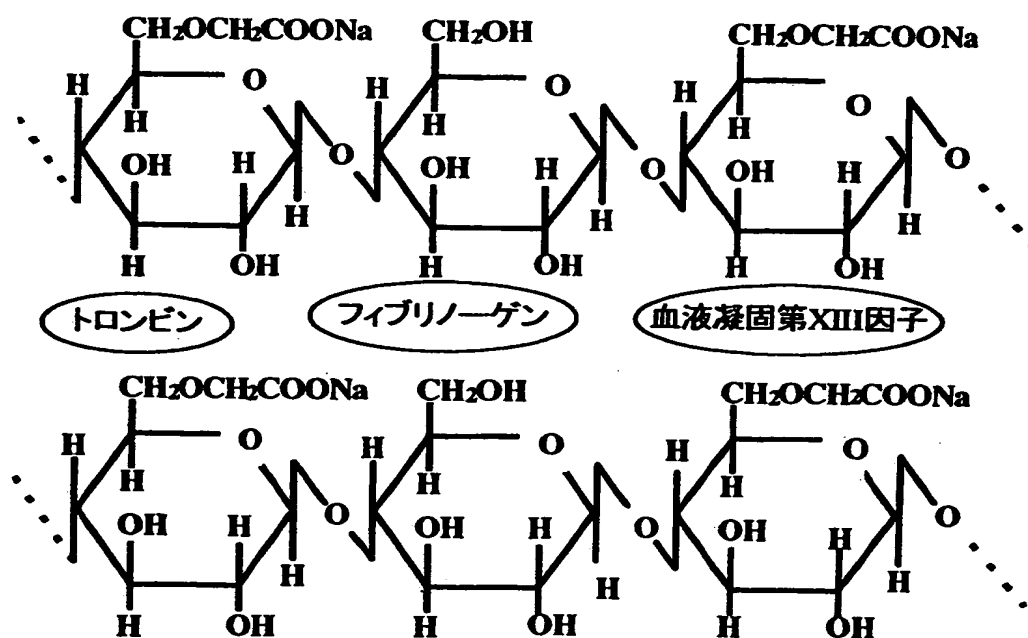
そして、本願発明は、上述のように製造した凝固蛋白質を含む各種可溶性創傷治癒止血セルコース繊維を、それぞれ創傷部に施用することにより止血治癒作用を高めてなるようにするものである。

【0019】

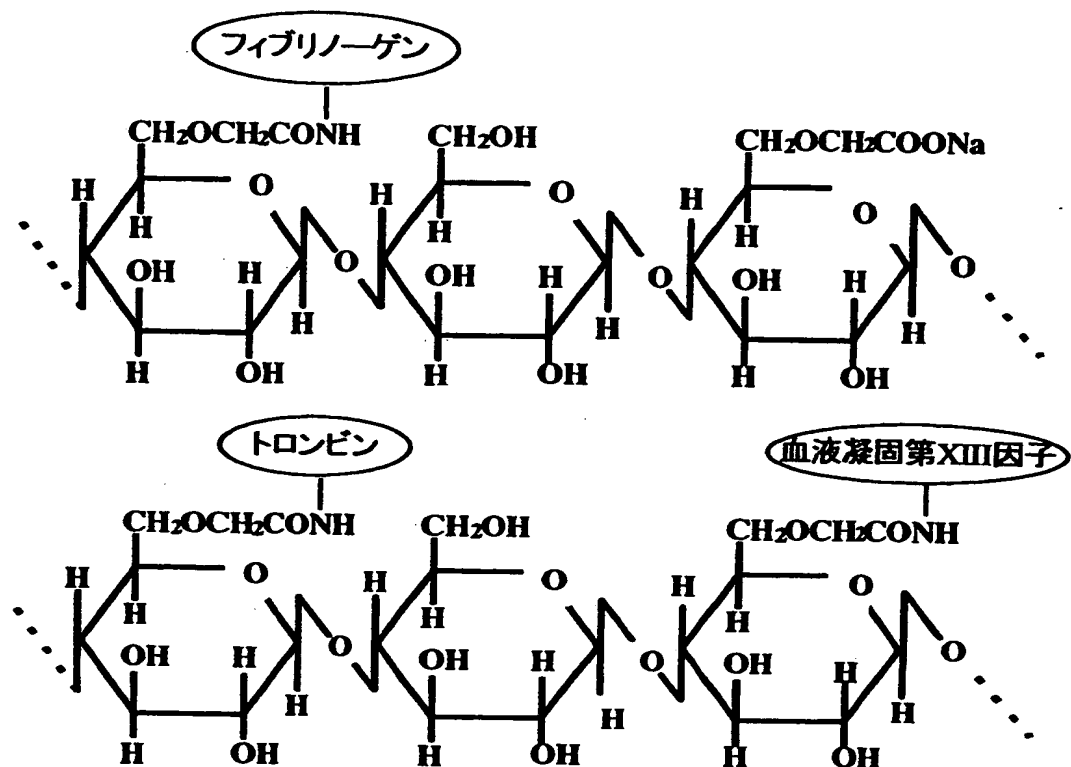
なお、本願発明における好ましい凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルコース繊維は、セルコースを構成する構造単位として次の概略的な化学式〔化1〕または〔化2〕でもって表されるものと推測される。なお、〔化1〕は、凝固蛋白質が塗布手段によって付与された状態を示すものであり、また、〔化2〕は凝固蛋白質が化学的結合手段によって付与された状態を示すものである。

【0020】

【化1】



【化 2】



【0021】

【実施例】

以下に本願発明の凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の具体的な製造実施例、ならびに創傷治癒効果及び止血効果を実施試験例にて記述する。

可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の製造実施例としては、特願平11-58412号に記載の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の製造法、すなわち、20本の甘藷りの糸を引き揃えて太さを40番手とした引き揃え糸を1/2斜紋織り（いちにしゃもんおり）の織地に成形した天然もしくは再生セルロース繊維70gを1000mLの回転式反応容器に入れ、これに45%水酸化ナトリウム水溶液の38容量と95%エタノール62容量とからなる水酸化ナトリウムのエタノール溶液250mLを加え、よく浸潤させて25℃で2時間攪拌した。次に、こ

の反応液中に、モノクロロ酢酸の40容量と95%エタノール60容量とからなるモノクロロ酢酸反応溶液210 mLを加え、4～18時間程攪拌した。反応終了後、得られた繊維を含む液の水素イオン指数(pH)を20%塩酸で7.0に調製し、さらに繊維中の塩化ナトリウムの含有量が1%以下になるまで60～95%エタノール水溶液にて洗浄した。かくして処理されたセルロース繊維を、乾燥、滅菌し、目的物であるエーテル化度(カルボキシメチル基への置換度)が0.5～1.0未満の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維を得た。なお、以下の各試験例において記述する「可溶性創傷治癒止血セルロース繊維」は、特に言及しない限り上記の手段にて得られる可溶性創傷治癒止血セルロース繊維を言うものとする。

#### 【0022】

次に、試験例1として、得られた可溶性創傷治癒止血セルロース繊維のエーテル化度(カルボキシメチル基への置換度)が0.5～1.0未満であることを確認するために、モノクロロ酢酸反応溶液との攪拌時間に対応するエーテル化度の測定をそれぞれ行った。測定方法は、上記実施例にてモノクロロ酢酸反応溶液との攪拌を2, 4, 8, 14, 18時間行うことによりそれぞれ製造した各可溶性創傷治癒止血セルロース繊維1 gを細かく切り、すり合わせ三角フラスコ(50 mL)中に入れ、硝酸メタノール溶液25 mL(メタノール100 mLと硝酸10 mLの混合液)を加えて1時間振とうし、水素型の試料とする。次いで、ガラスフィルター(G3)で吸引ろ過することにより試料をトラップし、800 g/Lメタノール溶液(無水メタノール100 mLと水20 mLの混合液)120 mL(40 mL×3回)で試料を洗浄し、最後に無水メタノール25 mLで洗浄後、吸引ろ過し、フィルター上の試料を105℃で2時間乾燥する。さらに、水素型となった試料0.2 gを精密に秤量し、すり合わせ三角フラスコ(100 mL)に入れ800 g/Lメタノール8 mLおよび0.1 mol/L水酸化ナトリウム標準液20 mLを加え25℃で30分振とうし、水素型の試料をナトリウム型にする。そして、余剰の水酸化ナトリウム量を規定度既知の0.05 mol/Lの硫酸でフェノールフタレインを指示薬として滴定することにより求め、それよりエーテル化度を求めることにより行った。測定した結果を[表1]に示す。

【 0 0 2 3 】

【表 1】

可溶性創傷治癒止血 セルロース繊維番号	エーテル化度(カルボキシメチル基の置換度)				
	攪拌反応時間(hr)				
	2	4	8	14	18
1	0.410	0.612	0.701	0.801	0.856
2	0.401	0.611	0.693	0.793	0.823
3	0.421	0.632	0.721	0.812	0.842
4	0.425	0.625	0.688	0.801	0.825
5	0.416	0.601	0.701	0.812	0.831

【 0 0 2 4 】

上記【表 1】に示す結果の通り、モノクロロ酢酸との反応時間が 4 時間以上で、置換度 0.5 以上の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維を製造することができる。従って、モノクロロ酢酸との反応時間を制御することによりカルボキシメチル基の置換度を制御できることが分かる。

【 0 0 2 5 】

次に、試験例 2 として、凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の製造法、すなわち、可溶性創傷治癒止血セルロース繊維とされた天然もしくは再生セルロース繊維への凝固蛋白質の付与方法について説明する。そして、凝固蛋白質の付与方法としては、塗布法と化学的結合法の 2 種類の方法が考えられるため、以下にそれぞれ説明する。

【 0 0 2 6 】

まず、可溶性創傷治癒止血セルロース繊維は水に対しては可溶であるが、60%以上のエタノールを含む水溶液の場合、溶解せず繊維状態を保つことが出来るものである。塗布法としては、上記実施例にて製造した可溶性創傷治癒止血セルロース繊維（モノクロロ酢酸との反応時間が 14 時間のもの）15.6mg ( $1\text{ cm}^2$ ) に、凝固蛋白質であるフィブリノーゲン 5mg、トロンビン 1.



5 単位、血液凝固第 XIII 因子 8 単位を含む 6 0 % エタノール溶液 0. 2 m L を送風機で乾燥させながら均一に噴霧することにより、塗布させた凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維を得た。

## 【 0 0 2 7 】

一方、化学的結合法としては、カルボジイミドを用いる方法によって行い、上記実施例にて製造した可溶性創傷治癒止血セルロース繊維（モノクロロ酢酸との反応時間が 1 4 時間のもの）1 5. 6 m g を 5 m L 容ガラス試験管に入れ、6 0 % エタノール溶液 1 m L を添加後、1 - エチル - 3 - （3 - ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド 3 8 m g を加え、3 0 ℃ で 2 時間攪拌した後、反応液を除去し、該カルボジイミド試薬で処理した可溶性創傷治癒止血セルロース繊維を 6 0 % エタノール溶液 3 m L で 3 回洗浄した。次に、凝固蛋白質であるフィブリノーゲン 5 m g、トロンビン 1. 5 単位、血液凝固第 XIII 因子 8 単位を含む 6 0 % エタノール溶液 1 m L を加え、3 0 ℃ で 2 時間反応させた。そして、未反応のカルボキシル基をブロックするため、L - リシン 2 9 m g を加え、さらに 3 0 ℃ で 1 時間反応させた後、反応液を除去し、反応後の可溶性創傷治癒止血セルロース繊維を 6 0 % エタノール溶液 3 m L で 3 回、9 5 % エタノール溶液 3 m L で 1 回洗浄した。そして、これを 5 0 ℃ で 5 分間乾燥することにより、化学的に結合させた凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維を得た。

## 【 0 0 2 8 】

次に、試験例 3 として、上記塗布法及び化学的結合法によりそれぞれ得られた凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の可溶性を確認するために、凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の 0. 9 5 % 食塩水と純水に対する可溶性を測定した。測定方法は、凝固蛋白質をそれぞれの方法で含む各可溶性創傷治癒止血セルロース繊維 0. 1 g を（0. 1 w / v % になるように）、1 0 0 m L の 0. 9 5 % 食塩水および純水にそれぞれ加え、2 5 ℃ で攪拌しながら、目視で不溶物が消失するまでの時間を観察した。その結果を〔表 2〕に示す。

## 【 0 0 2 9 】

【表 2】

調製方法	凝固蛋白質を含む可溶性創傷 治癒止血セルロース繊維番号	溶解するまでの時間(分)	
		純水	0.95%食塩水
塗布法	1	10	18
	2	11	19
	3	9	17
	4	12	17
	5	10	19
化学的 結合法	1	9	19
	2	11	19
	3	10	18
	4	9	17
	5	11	19

## 【0030】

上記【表 2】に示す結果の通り、本願発明の凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維は、凝固蛋白質を付与する方法が塗布法又は化学的結合法の何れの場合であっても共に純水にも食塩水にも確実に、かつ速やかに完全に溶解するものであることが分かる。

## 【0031】

次に、試験例 4 として、同じく塗布法及び化学的結合法によりそれぞれ得られた凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維のフィブリンモノマー凝集活性を確認するために、350nmでの吸光度の測定を紫外可視分光光度計 U-3210（日立製作所製）を用いて行った。吸光度の測定は 1w/v%の凝固蛋白質をそれぞれ含む各可溶性創傷治癒止血セルロース繊維（塗布法により調製したもの及び化学的結合法により調製したもの）の存在下、可溶性創傷治癒止血セルロース繊維（すなわち、凝固蛋白質が付与されていないもの）の存在下、及び可溶性創傷治癒止血セルロース繊維非存在下（コントロール）の 0.15mol/L塩化ナトリウム（NaCl）を含む 20mmol/Lイミダゾール緩衝液（pH7.4）500μLに、20mmol/L酢酸に溶解したフィブリンモノマー（A280nm=6）を 20μL添加し、フィブリンモノマー添加 20秒後から 30秒毎に 25分間 350nmの吸光度を測定することにより行った。その

測定した結果を〔図1〕に示す。

【0032】

〔図1〕に示す結果より、凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維は、凝固蛋白質を付与する方法が塗布法又は化学的結合法の何れの場合であっても共にフィブリンモノマーの凝集を著しく促進し、さらに、凝固蛋白質が付与されていない可溶性創傷治癒止血セルロース繊維に比してもフィブリンモノマー凝集促進活性が一層優れたものとなることが分かる。

【0033】

次に、試験例5として、同じく塗布法及び化学的結合法によりそれぞれ得られた凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の血小板凝集促進活性の確認と、該凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の血小板凝集促進活性が可溶性創傷治癒止血セルロース繊維（すなわち、凝固蛋白質が付与されていないもの）に比して一層優れたものとなることを確認する為に、血小板凝集能の測定を血小板凝集計（メバニクス社製）を用いて行った。血小板凝集能の測定は1w/v%の凝固蛋白質をそれぞれの方法で含む各可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の存在下、可溶性創傷治癒止血セルロース繊維（すなわち、凝固蛋白質が付与されていないもの）の存在下、及び可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の非存在下での各0.15mol/L塩化ナトリウム（NaCl）を含む20mmol/Lイミダゾール緩衝液と富血小板血漿を1：1の割合で混合し、血小板凝集剤として種々の濃度のアデノシン二リン酸（ADP）を添加し、反応液の濁度変化を測定することにより行った。その測定した結果を〔表3〕および〔図2〕に示す。

【0034】

【表 3】

	チャンネル 番号	ADP 濃度 ( $\mu$ mol/l)	最大凝集率 (%)	出現時間 (min)	5.0 分値 凝集(%)	5.0 分面積	解離率 (%)
可溶性創傷治癒 止血セルロース 繊維の非存在下	1	0.5	63	1.9	52	2795	38
	2	1.0	62	2.7	57	2783	20
	3	2.0	66	2.7	66	2973	10
	4	4.0	65	3.7	65	2839	3
可溶性創傷治癒 止血セルロース 繊維の存在下	5	0.5	65	3.7	64	2910	8
	6	1.0	68	6.1	68	2943	0
	7	2.0	69	6.5	68	2929	0
	8	4.0	68	6.5	68	2929	0
塗布法で調製した 凝固蛋白質を含む 可溶性創傷治癒 止血セルロース繊維 の存在下	9	0.5	99	10	95	2910	0
	10	1.0	97	9.5	96	2950	0
	11	2.0	94	9.8	98	2960	0
	12	4.0	95	9.7	92	2930	0
化学的結合法で調 製した凝固蛋白質 を含む可溶性創傷 治癒止血セルロ ース繊維の存在下	13	0.5	95	9.9	94	2940	0
	14	1.0	96	9.7	94	2950	0
	15	2.0	99	9.9	97	2940	0
	16	4.0	98	9.8	95	2970	0

## 【0035】

【表 3】 および 【図 2】 に示す結果より、凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維は、凝固蛋白質を付与する方法が塗布法又は化学的結合法の何れの場合であっても共に血小板の凝集を著しく促進し、さらに、凝固蛋白質が付与されていない可溶性創傷治癒止血セルロース繊維に比して血小板凝集促進活性が一層優れたものとなることが分かる。

## 【0036】

次に、試験例 6 として、同じく塗布法及び化学的結合法によりそれぞれ得られた凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の細胞接着促進活性を確認するとともに、細胞接着促進活性が可溶性創傷治癒止血セルロース繊維（すなわち、凝固蛋白質が付与されていないもの）に比して一層優れたものとなることを明らかにするために、1 w/v % の凝固蛋白質をそれぞれの方法で含む各可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の添加の下で接着した細胞数の測定を、可溶性創傷治癒止血セルロース繊維（すなわち、凝固蛋白質が付与されていないもの）の添加の下で接着した細胞数の測定、及び可溶性創傷治癒止血セルロース繊維等未

添加の場合に接着した細胞数の測定とともに行った。接着した細胞数の測定は、細胞接着蛋白フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、コラーゲン、あるいはフィブリンを種々の濃度で96ウェルプレートに被覆し、その上に5,000個のNIH-3T3を入れ、6時間後に一定接着した細胞の数を一定視野で測定することにより、細胞接着活性を示さない各接着蛋白の濃度を求め、これに1w/v%の凝固蛋白質をそれぞれの方法で含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維あるいは可溶性創傷治癒止血セルロース繊維を各々添加することにより、もしくは何ら添加しないことにより、接着した細胞数を一定視野で測定することより行った。測定した結果を〔表4〕に示す。

【0037】

〔表4〕

細胞接着蛋白	細胞接着蛋白濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	接着細胞数			
		可溶性創傷治癒止血セルロース繊維未添加	可溶性創傷治癒止血セルロース繊維添加	塗布法で調製した凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維添加	化学的結合法で調製した凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維添加
フィブロネクチン	0.1	20	80	320	313
ビトロネクチン	0.5	10	60	295	290
ラミニン	0.1	12	56	290	300
コラーゲンI	0.1	5	60	289	285
コラーゲンIII	0.1	8	62	292	296
フィブリン	0.1	10	60	290	299

【0038】

〔表4〕に示す結果より、凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維は、凝固蛋白質を付与する方法が塗布法又は化学的結合法の何れの場合であっても共に接着細胞数を著しく増加させること、すなわち細胞接着促進活性を有することが分かるとともに、凝固蛋白質が付与されていない可溶性創傷治癒止血セルロース繊維に比して細胞接着促進活性が一層優れたものとなることが分かる。

【0039】

次に、試験例7として、創傷患部に、同じく塗布法及び化学的結合法によりそれぞれ得られた凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維をそれぞれ

施用した際の止血効果と創傷治癒効果を確認するとともに、止血効果と創傷治癒効果が可溶性創傷治癒止血セルロース繊維（すなわち、凝固蛋白質が付与されていないもの）に比して一層優れたものとなることを明らかにするために、1 w/v %の凝固蛋白質をそれぞれの方法で含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維を創傷患部に各々施用した際の止血時間の測定及び創傷部の治癒度の確認を、可溶性創傷治癒止血セルロース繊維を創傷患部に施用した際の止血時間の測定及び創傷部の治癒度の確認、及び可溶性創傷治癒止血セルロース繊維非施用の場合の止血時間の測定とともに行った。止血時間の測定は、10匹のラットの肝臓をそれぞれ1 cm×1 cm四方に切断し、創部に凝固蛋白質を含む各可溶性創傷治癒止血セルロース繊維あるいは可溶性創傷治癒止血セルロース繊維を貼付し、もしくは何ら（可溶性創傷治癒止血セルロース繊維は）貼付しないで、止血した時間（秒）を測定することにより行い、その際の止血効果を未処置のもの及び凝固蛋白質非付与のものと比較して確認し、また、治癒度の確認は、それぞれの方法で凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維あるいは可溶性創傷治癒止血セルロース繊維を創部に各々貼付し、止血時間の測定をした後閉腹し、1ヶ月後に開腹して創部の病理切片を調製し顕微鏡にて治癒度を目視確認することにより行った。測定した結果及び確認した結果を〔表5〕に示す。なお、創傷部の治癒度の確認は、正常と同じであるものを◎印、少し炎症しているものを○印、炎症癒着しているものを×印で示すこととした。

【0040】

【表 5】

ラット番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均	CV
可溶性創傷治癒止血セルロース繊維 未処理での止血時間(秒)	152	141	180	160	120	150	120	137	165	201	153	16.7%
可溶性創傷治癒止血セルロース繊維 処理での止血時間(秒)	29 ⊙	32 ⊙	31 ⊙	37 ⊙	34 ⊙	35 ⊙	32 ⊙	27 ⊙	35 ⊙	35 ⊙	33	9.5%
塗布法で調製した凝固蛋白質を含む可溶性 創傷治癒止血セルロース繊維処理での止血 時間(秒)	10 ⊙	12 ⊙	13 ⊙	11 ⊙	8 ⊙	9 ⊙	12 ⊙	11 ⊙	10 ⊙	9 ⊙	11	15.1%
化学的結合法で調製した凝固蛋白質を含む 可溶性創傷治癒止血セルロース繊維処理で の止血時間(秒)	11 ⊙	10 ⊙	12 ⊙	9 ⊙	12 ⊙	11 ⊙	8 ⊙	9 ⊙	10 ⊙	12 ⊙	10	13.7%

## 【0041】

【表 5】に示す結果により、可溶性創傷治癒止血セルロース繊維は著しい止血効果を持ち、かつ、可溶性創傷治癒止血セルロース繊維による処置を施した 10 匹のラットは、ほとんど完全に治癒して全く炎症等を生じていないことから、凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維は、凝固蛋白質を付与する方法が塗布法又は化学的結合法の何れの場合であっても共に可溶性創傷治癒止血セルロース繊維に比べても著しい止血効果と創傷治癒効果を有することが分かる。

## 【0042】

以上のように製造された本願発明の凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維は、凝固蛋白質を付与する方法が塗布法又は化学的結合法の何れの場合であっても共に創傷部位に施用すると血液および組織液の水分を吸収し、血液及び組織液の濃度および粘度を増加させ、該凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維に含まれるフィブリノーゲン、トロンビン及び血液凝固第 XIII 因子の作用により強固なフィブリン凝集物を作成させることにより、血液および組織液の流れる速度を減少させるようにして効果的に止血作用を発揮させるとともに、創部において血小板の粘着と凝集を補助し、止血作用を発揮するものである。

【 0 0 4 3 】

さらに、本願発明の凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維は、フィブロンекチン等の接着蛋白と相互作用し、創傷治癒で重要な役割を示す繊維芽細胞の増延を補助するものでもある。

【 0 0 4 4 】

なお、上記実施試験例は、凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維のナトリウム塩について説明したが、本願発明はこれに限らず、凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維のカルシウム塩や、複数の塩が混在しているものであっても何ら制限されるものではない。

【 0 0 4 5 】

また、上記実施試験例はいずれも織地に成形した凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維について説明したが、本願発明はこれに限らず、糸状に成形したものや、糸状もしくは織地状の凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維に粉碎処理を施すことにより粉状に成形したもの、さらに、糸状もしくは織地状の凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維に反毛処理を施すことにより綿状に成形したものであっても、目的とする凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血効果を発揮するものであれば本願発明に含まれてなるものであることは言うまでもない。

【 0 0 4 6 】

【発明の効果】

以上のように本願発明の凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維は、止血作用が非常に速く効果的で、炎症反応をほとんど起こさず体内吸収性が速やかにおこり、創傷治癒効果が高いものである。

【 0 0 4 7 】

また、本願発明の凝固蛋白を含む可溶性創傷治癒止血材は、効率よく患部の止血および細胞接着促進性に基づく創傷治癒効果が可能であるとともに、体内、体外の止血創傷治癒材として非常に有効であり、創傷部位の治癒効果を高める創傷被覆止血材として広い応用分野の可能性のあることを見出すことが出来た。

【図面の簡単な説明】

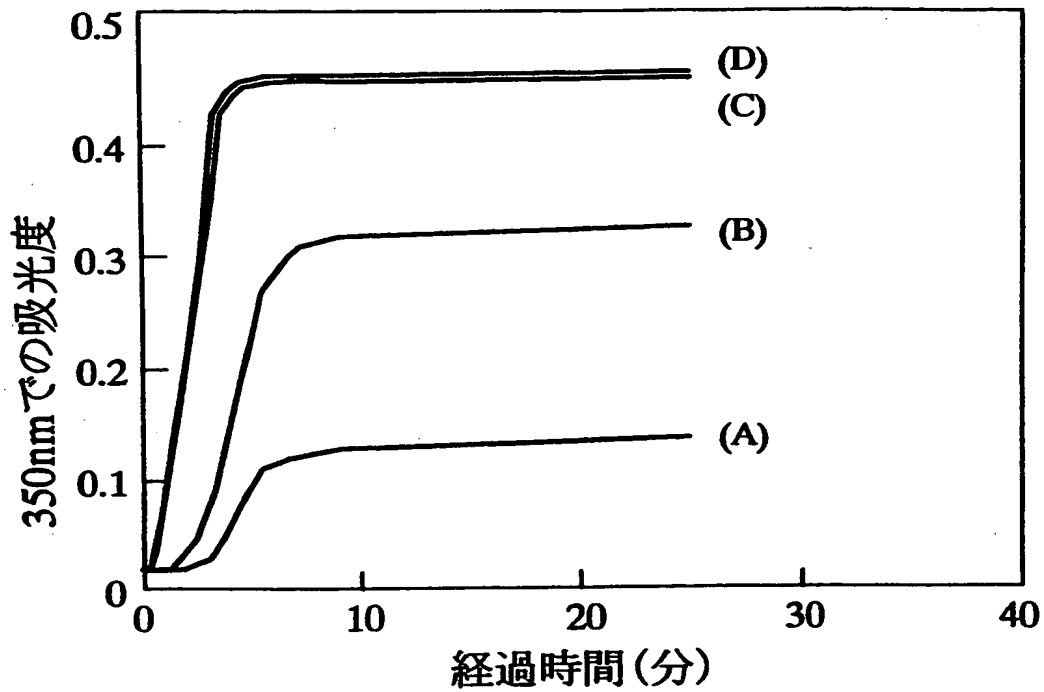


【図 1】フィブリモノマーの凝集反応に対する塗布法及び化学的結合法の 2 種類の方法によって製造した凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維の効果を示す吸光度を測定した吸光度と時間の関係を示す図。

【図 2】（A）可溶性創傷治癒止血セルロース繊維非存在下での血小板の凝集状態を測定した凝集率と時間の関係を示す図、（B）可溶性創傷治癒止血セルロース繊維存在下での血小板の凝集状態を測定した凝集率と時間の関係を示す図、（C）塗布法で調製した凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維存在下での血小板の凝集状態を測定した凝集率と時間の関係を示す図、（D）化学的結合法で調製した凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維存在下での血小板の凝集状態を測定した凝集率と時間の関係を示す図。

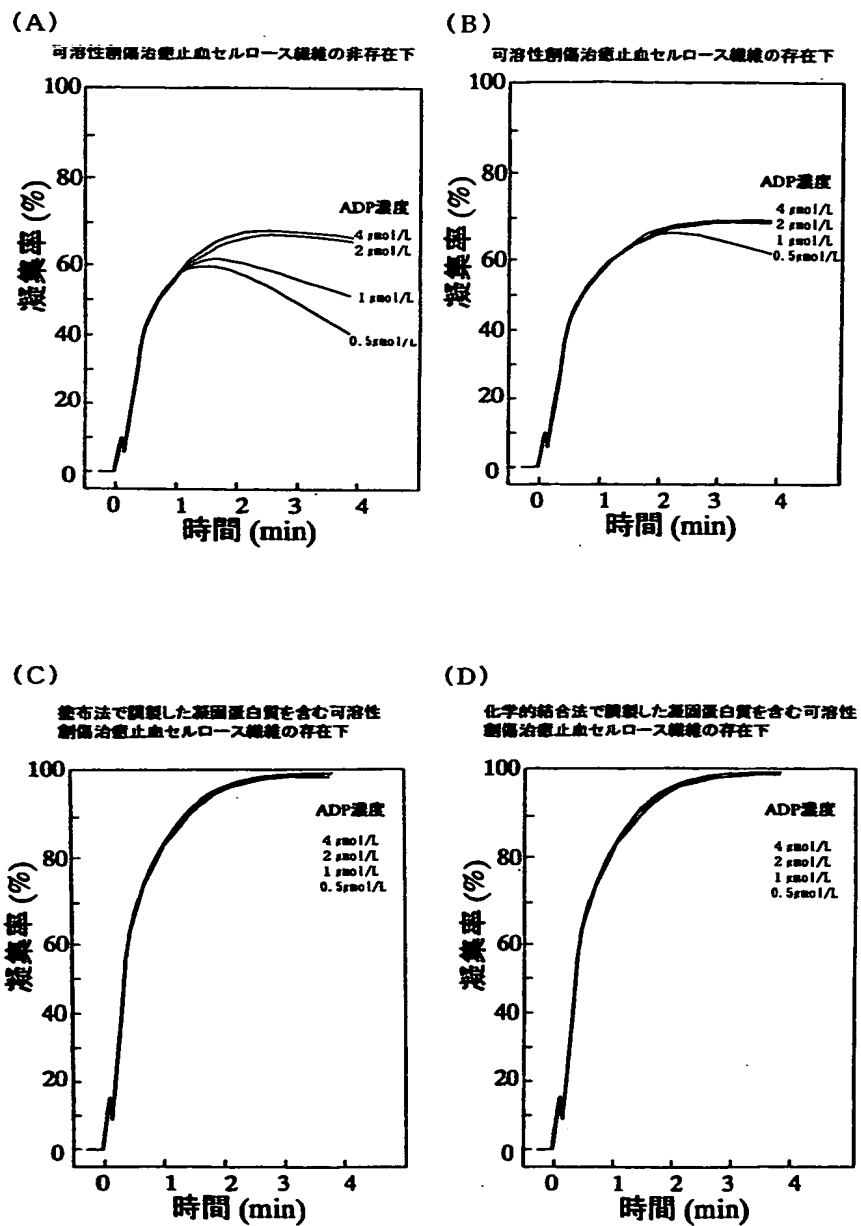
【書類名】 図面

【図 1】



- (A) : 可溶性創傷治癒止血セルロース繊維非存在下 (コントロール) 、
- (B) : 1 % 可溶性創傷治癒止血セルロース繊維存在下、
- (C) : 塗布法で調製した 1 % 凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維存在下、
- (D) : 化学的結合法で調製した 1 % 凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維存在下、

【図 2】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】出血創部に適用したときにその出血創傷部の水分を吸収して容易に溶解し、血液成分の血小板およびフィブリンの止血作用および創部への細胞接着を補助する新規な可溶性創傷治癒止血セルロース繊維を提供する。

【解決手段】天然もしくは再生セルロース繊維を水酸化ナトリウム水溶液で処理した後、セルロース分子を構成するグルコース単位中の水酸基を部分的に置換度（エーテル化度）が0.5－1.0未満になるようにモノクロロ酢酸溶液と一定時間反応させてカルボキシメチル化し、さらに、凝固蛋白質フィブリノーゲン、トロンビン、血液凝固第XIII因子を塗布あるいは化学結合させることにより凝固蛋白質を含む可溶性創傷治癒止血セルロース繊維を調製する。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 1 3 7 0 5 2 ]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 2 2 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都文京区湯島1丁目12番4号
氏 名	株式会社ホギメディカル

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**